

DESCOBERTOS NOVOS VÍRUS E UM VIROIDE NAS CVS. ROYAL GALA E MISHIMA NO BRASIL

É provável que algumas doenças causadas por vírus e viroides acompanham macieiras e outras rosáceas desde os primórdios da sua domesticação pelo homem há milhares de anos. Nestas espécies vegetais exóticas, originárias da Ásia Central, agentes patogênicos coexistiram e coevoluíram provavelmente com os seus hospedeiros, adaptando-se mutuamente. A macieira, como a maioria das fruteiras lenhosas, é plantada sobre porta-enxertos. Na enxertia, uma prática milenar, já conhecida por volta de 3000 anos a.C. o “cavalo” confere à copa características desejáveis como o vigor, adaptação a certos solos, o sistema radicular e a resistência a doenças, entre outras. O filósofo grego Teofrasto, tido como fundador da botânica, três séculos a.C. teria sido autor de um catálogo de espécies de fruteiras compatíveis (enxertáveis) entre si. Vírus e viroides podem ter encontrado na propagação pela enxertia, desde tempos remotos, um eficaz meio para sua transmissão e disseminação, pela ação do homem, além das fronteiras da(s) espécies ancestrais, vindo a infectar novas espécies e cultivares.

Atualmente, é muito comum encontrar-se em material propagativo de macieiras na região Sul do Brasil um coquetel de infecções múltiplas de vírus latentes apple chlorotic leaf spot vírus (ACLSV), apple stem grooving vírus (ASGV), apple stem pitting virus (ASPV) e do apple mosaic virus (ApMV), em complexo com outros patógenos virais, provavelmente introduzidos no país com as variedades de macieiras importadas no início da pomicultura no país. Desde os anos 1990 até o presente observam-se focos recorrentes de infecção com altos níveis de mortalidade de plantas de viveiro, devidos a infecções mistas por vírus latentes nas principais regiões pomicultoras de Vacaria (RS), Lages, São Joaquim e Fraiburgo (SC) (O. Crestani, 1999; Relatório de Pesquisa Embrapa/CNPq). Recentemente foram relatadas infecções latentes em materiais usados no melhoramento de macieiras em instituições de pesquisa (Manenti et al., 2020). Adicionalmente, uma série de doenças de provável natureza viral em macieiras observadas no Sul do Brasil ainda não foram elucidadas quanto aos seus agentes causais. Incluem-se aqui “depressão do lenho” (DL), “descascamento do tronco da platycarpa” e “nanismo de platycarpa”, “rachadura-estrela”, além de mosaicos diversos ainda não esclarecidos como o mosaico necrótico. A DL induz depressões lineares, longitudinais, passando a canaletas profundas e necroses nos troncos e galhos (Figura 1). Descrita em 1887, no Canadá na cv. Gravenstein, foi observada também em pereiras e marmeleiros. Há relatos de que DL e LM seriam causadas pelo mesmo agente patogênico. Ambas doenças provocam uma disfunção na lignificação do xilema, à semelhança do que acontece com a “gomose côncava dos citros”. Doenças de plantas em frutos, troncos e galhos, especialmente as lenhosas, dificultam, geralmente, a sua caracterização pelo longo tempo de incubação até o aparecimento de sintomas após a infecção que pode levar entre alguns meses e, no caso da DL, até oito anos, além de serem dificilmente transmissíveis pela via mecânica para hospedeiros experimentais herbáceos, em que a replicação viral é mais vigorosa.

A revolução tecnológica ocorrida na virologia nos últimos anos com o advento do sequenciamento de alta capacidade (next-generation sequencing) permitiu

uma epidemia de declínios, os vírus ARWV 1 e 2 e CCGaV foram diagnosticados nas cvs. Fuji, Gala e Golden Delicious em M9 e Honeycrisp em porta-enxerto Geneva 935 com sintomas de “morte súbita/declínio rápido”; plantas com sintomas estavam fortemente infectadas por até oito diferentes espécies virais. O terceiro vírus diagnosticado no presente estudo, Citrus concave gum-associated vírus (CCGaV) é associado à doença “gomose côncava” dos citros, descrita há quase um século na Califórnia, EUA. O vírus foi caracterizado em citros na Espanha em 2018 e é suspeito de estar associado, juntamente com ARWV 1 e 2, a uma disfunção que causa declínio de macieiras nos estados do nordeste dos EUA. O CCGaV foi constatado nas amostras das cvs. Royal Gala e Mishima, coletadas em Vacaria, RS, e analisadas na Embrapa Uva e Vinho por HTS. Adicionalmente, foram constatadas nas três cvs. analisadas, Royal Gala, Mishima e Braeburn, sequências de nucleotídeos quase completas de, respectivamente, 60, 9 e 8 isolados dos vírus latentes já conhecidos ASPV, ASGV e ACLSV, e isolados de ASPV (apple stem pitting virus) que na análise filogenética revelaram-se mais próximos de Apple green crinkle associated virus, associado à “ruga verde” da macieira. Sequências de ARWV 1 e 2, CCGaV, do viroide Apple hammerhead viroid (AHVd), e dos vírus latentes obtidas por HTS em macieiras, foram depositadas na base de dados GenBank (Nickel et al., 2020).

Finalmente, mas não menos importante, o sequenciamento HTS, revelou dados que permitem suspeitar-se ainda da presença de Apple luteovirus 1 (ALV 1) nas amostras aqui analisadas. Sequência de cerca de 50% do genoma de ALV-1 foi obtida neste estudo na cv. Braeburn. A importância deste vírus para a pomicultura brasileira deriva do fato, que o agente já foi relatado em macieiras em várias partes do mundo, incluindo Grécia, China, EUA e Coreia do Sul. No nordeste dos EUA o vírus foi também associado a um “declínio rápido”, especialmente das cvs. Fuji, Gala e Golden Delicious enxertadas em vários porta-enxertos, mas o M9 é o mais afetado, em que as plantas apresentam cancos e rachaduras nos porta-enxertos e/ou do tronco das copas; necrose começa na união de enxertia e avança pela copa, e declinam antes de entrar em súbito colapso no verão (Liu et al. 2018). Na Coreia do Sul o vírus ALV 1 foi detectado em infecção complexa com ARWV 1 em clones de M9. Análises sobre o ALV 1 continuam em execução na Embrapa Uva e Vinho para confirmar a sua presença.

Analisando a frequência de ocorrência destes novos vírus com checagem aleatória por RT-PCR de outras 12 amostras de diferentes cultivares coletadas em pomares na região dos Campos de Cima da Serra, demonstrou-se que estes vírus estavam presentes respectivamente em 9 (ARWV 1), 1 (ARWV 2) e 2 (CCGaV) das amostras analisadas (Menegotto et al., 2020). O resultado é uma indicação de que estes vírus podem ter uma disseminação significativa no material propagativo de macieira em uso na região. Estudos abrangentes sobre a frequência de ocorrência destes novos agentes, além dos trabalhos que buscam confirmar a presença de ALV-1 e AGCaV em pomares comerciais no sul do Brasil, estão em andamento na Embrapa Uva e Vinho.

A revolução tecnológica ocorrida na virologia nos últimos anos com o advento do sequenciamento de alto desempenho (inglês: High-Throughput Sequencing, HTS), também conhecido como Next-Generation Sequencing (NGS), permitiu um monumental avanço na caracterização de novos vírus de plantas e na elucidação de doenças já conhecidas de longa data em curto espaço de tempo. Em cerca de dez anos, 2011 a 2020, o número de vírus descritos em macieiras, com o uso do HTS mais que dobrou com novas espécies virais, atingindo atualmente mais de 20 espécies virais no mundo. Dois novos viroides foram acrescentados aos seis viroides anteriormente já conhecidos.

O uso desta tecnologia, chamada metagenômica, que permite sequenciar genomas virais completos sem conhecimento prévio de sequências do patógeno, levou à descoberta de novas espécies virais em macieiras ao redor do mundo. No presente estudo, três novos vírus e um viroide, além de haver suspeita da presença de dois outros vírus, foram detectados em estudos da Embrapa Uva e Vinho, em amostras de macieiras Royal Gala, Mishima e Braeburn coletadas em Vacaria, RS, região dos Campos de Cima da Serra. Os três vírus descobertos, Apple rubbery wood virus (ARWV) 1 e 2 e Citrus concave gum-associated virus (CCGaV) pertencem à família Phenuiviridae.

Os vírus ARWV 1 e 2, associados à doença do Lenho Mole da macieira (LM), foram primeiramente descobertos e descritos em amostras de macieiras da Alemanha (19 amostras), do Canadá (1), Japão (1) e dos EUA (3) (Rott et al. 2018). Em nosso estudo, ARWV 1 e 2 foram diagnosticados, por HTS, respectivamente, nas cvs. Mishima e Royal Gala, e confirmado por RT-PCR em outras amostras de Gala (ARWV1) e Fuji (ASGV, ARWV1 e 2, CCGaV). A doença LM descrita há quase um século na Inglaterra, foi observada no Brasil em vários surtos, nos anos 1970 e no final dos anos 1990 e início dos anos 2000 na região de Vacaria, RS. O sintoma típico desenvolvido pelas plantas afetadas é uma flexibilidade anormal de ramos e galhos devido a um bloqueio na síntese de lignina do sistema vascular dos troncos e galhos (xilema) que os leva a se curvarem sob o próprio peso (Figura 2). Na época da ocorrência, estimou-se que uma alta porcentagem das plantas em pomares do RS e SC da cultivar Royal Gala poderia estar infectada. Entretanto, não há registros experimentais dessa estimativa. No noroeste dos EUA, onde, nos últimos anos ocorre

Uva e Vinho.

Os abrangentes resultados deste sequenciamento por HTS e confirmação por RT-PCR fornecem novos e importantes subsídios para o diagnóstico e a caracterização do estado sanitário de macieiras e representam um avanço significativo para incrementar a sanidade do material propagativo em uso no Brasil. Adicionalmente, diante do risco que significam estes novos agentes infecciosos para a economia nacional, os dados obtidos podem subsidiar medidas de controle na introdução de material de plantio ou propagação de macieiras. Para os agentes públicos, os novos dados podem orientar estratégias de gerir o comércio e o intercâmbio de material genético. Os dados sobre os novos vírus são um instrumento importante para o estudo destes agentes, e do seu impacto sobre o desempenho de cvs. infectadas. O presente estudo foi financiado pela Embrapa (Proj.nº 20.18.036.00.00) e apoiado por bolsas de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.



Figura 1 - Depressão do lenho, cv RoyalGala, ramos de plantas com cerca de três anos de idade, Caxias do Sul, RS. (Fonte: O. Nickel).

Figura 2 -- Curvatura de ramos em cv. Gala, com suspeição de infecção por Lenho Mole, 2016, Vacaria,RS (Fonte: R.M. Valdebenito Sanhueza).

Referências

- Manenti, D.C. 2020. Brazilian Archives of Biology and Technology. [Doi.org/10.15.90/1678-4324-2020190272](https://doi.org/10.15.90/1678-4324-2020190272); Menegotto, N.R. et al., 2020. 18º Encontro de Iniciação Científica, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS.; Nickel, O. et al., 2020. Plant Disease, doi.org/10.1094/pdis-02-20-0283-pdn; Rott, M.E., et al. 2018. Plant Disease. doi.org/10.1094/PDIS-06-17-0851-RE.